



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

STANDARD

SERVICE

CA

(11) Numéro de publication:

**0 367 644
A1**

(2)

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

(21) Numéro de dépôt: 89402764.8

(51) Int. Cl.⁵: **C12N 15/55 , C12N 9/78 ,
C12Q 1/68 , G01N 33/569 ,
A61K 39/106 , C12P 21/02**

(22) Date de dépôt: 06.10.89

(30) Priorité: 06.10.88 FR 8813135

(43) Date de publication de la demande:
09.05.90 Bulletin 90/19

(54) Etats contractants désignés:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(71) Demandeur: **INSTITUT PASTEUR**
25-28, rue du Docteur Roux
F-75724 Paris Cédex 15(FR)

Demandeur: **INSTITUT NATIONAL DE LA
SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE
(INSERM)**
101, rue de Tolbiac
F-75654 Paris Cédex 13(FR)

(72) Inventeur: **Labigne, Agnès**
47, avenue Beauséjour
F-91440 Bures sur Yvette(FR)

(74) Mandataire: **Gutmann, Ernest et al**
S.C. Ernest Gutmann - Yves Plasseraud 67,
boulevard Haussmann
F-75008 Paris(FR)

(54) Séquence de nucléotides codant pour une protéine à activité uréasique.

(57) L'invention concerne une séquence de nucléotides, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une partie d'une séquence codant pour une protéine à activité uréase telle qu'exprimée par C. pylori.

L'invention a également pour objet les applications de cette séquence, notamment pour le diagnostic in vitro de pathologies liées à la présence de Campylobacter pylori dans l'organisme d'un individu.

EP 0 367 644 A1

SEQUENCES DE NUCLEOTIDES CODANT POUR UNE PROTEINE A ACTIVITE UREASIQUE

L'invention a pour objet des séquences de nucléotides codant pour une uréase telle qu'exprimée naturellement chez Campylobacter pylori et ses applications biologiques, notamment pour la détection de C.pylori chez l'homme ou dans l'environnement.

C.pylori est une bactérie à gram négatif retrouvée à ce jour exclusivement à la surface de la muqueuse de la partie antrale de l'estomac chez l'homme, et plus particulièrement autour des lésions et des cratères des ulcères gastriques et duodénaux. 25% de la population est porteuse de C.pylori; 8% présentent une maladie ulcéreuse, 9% souffrent de dyspepsie non-ulcéreuse et 8% sont porteurs asymptomatiques.

Tous les C.pylori isolés et décrits à ce jour, possèdent les trois propriétés suivantes:

Les bactéries produisent une uréase dotée d'une grande activité.

Elles adhèrent très fortement aux cellules épithéliales de la muqueuse gastrique, cette propriété se traduisant *in vitro* par une très forte adhésion aux cellules Hela.

Les C.pylori produisent et libèrent une enzyme présentant une activité protéolytique conduisant à la dégradation du mucus et donc à un affaiblissement de la barrière naturelle protégeant la muqueuse gastrique.

La détection de C.pylori in situ, chez l'homme et dans l'environnement et l'étude de son pouvoir pathogène - elle est considérée comme responsable des gastrites actives chez l'homme - se heurtent toutefois aux difficultés de culture de cet organisme.

Sa croissance est très lente (6 à 7 jours sur milieu gélosé au sang), et doit s'effectuer dans des conditions de microaérophilie, l'oxygène de l'air étant toxique.

La recherche de moyens de détection de cette bactérie a conduit les inventeurs à identifier les gènes responsables chez C.pylori de la production d'uréase.

La détermination de la séquence de nucléotides d'un fragment intragénique a permis de disposer d'un outil utilisable comme sonde de détection pour l'identification spécifique des C.pylori.

L'invention a donc pour but de fournir de nouvelles séquences de nucléotides capables de coder pour des protéines à activité uréasique telles qu'exprimées chez C.pylori.

Elle a également pour but de fournir des fragments de cette séquence utilisables comme sondes de détection de C.pylori.

L'invention vise, en outre, à fournir une protéine à activité uréasique telle qu'exprimée chez C.pylori, de pureté élevée, et des fragments de cette protéine.

La séquence de nucléotides selon l'invention est caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une partie d'une séquence codant pour une protéine à activité uréase telle qu'exprimée chez C.pylori.

L'invention a plus particulièrement pour objet une séquence de nucléotides capable de s'hybrider avec des gènes codant pour une protéine à activité uréase telle qu'exprimée chez C.pylori, dans les conditions suivantes: 68° C, 6 x SSC (1 x SSC est constitué de 0,15M de NaCl et 0,015M de citrate de sodium, pH7), en milieu Denhardt (1% Ficoll, 1% polyvinylpyrrolidone, 1% de sérum albumine de boeuf).

Selon un autre aspect de l'invention, la séquence de nucléotides est caractérisée en ce qu'elle porte l'information requise pour la production d'une protéine à activité uréase ou de ses fragments, capables de former un complexe immunologique avec des anticorps dirigés respectivement contre une protéine d'activité uréase telle qu'exprimée chez C.pylori ou contre des fragments de cette dernière.

La séquence selon l'invention est également caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une partie d'un fragment d'environ 8kb correspondant au fragment de restriction EcoRI (Clal, BamHI)-PstI (HindIII).

La carte de restriction enzymatique de ce fragment est représentée sur la figure 2.

Une séquence plus spécialement préférée comprend au moins une partie d'un fragment d'environ 4,2kb ($\pm 5\%$) délimité par les nucléotides d'extrémité situés respectivement à une distance d'environ 0,55kb en amont du site H2 représenté sur la figure 2, et d'environ 0,7kb en aval du site B1 représenté sur la figure 2.

Les séquences constituées par ce fragment portent l'information nécessaire pour l'expression d'une protéine à activité uréase telle qu'exprimée naturellement chez C.pylori.

L'expression de ces séquences peut intervenir chez tout autre microorganisme capable d'exploiter à son profit l'information portée par ces séquences, notamment chez une souche de Campylobacter naturellement déficiente en gènes codant pour la production d'une protéine à activité uréase (ou encore souche de campylobacter uréase-).

Selon encore un autre aspect, l'invention vise une séquence recombinante comprenant l'une des séquences définies ci-dessus, le cas échéant associée à un promoteur capable de contrôler la transcription de la séquence et une séquence d'ADN codant pour des signaux de terminaison de la transcription.

Les séquences de nucléotides de l'invention sont caractérisées en ce qu'elles sont capables de

s'hybrider avec une sonde formée à partir de la séquence présentant:

- l'enchaînement (I) de nucléotides suivant:

AAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTATCAAAAATCTAAAAACGCCCTTTCTTCTCAAGCA ATTGTCGCTA-
CAAACATGAGCAATTTAGCCCTTAAAGAATACTTAAATCCCAAGATTTA GAATTGAAGCATTGCGC-
5 GATTGGGGATAAGTTTGTGAGCGAATGCATGCGATTGAACAAA GCCAATTTTGGAGGCGAG-
CAAAGCGGGCATATCATTTTATGCGATTACGCTAAAACCGGC GATGGCTTGGTGTGCGCTTTGCAAGT-
GAGCGCGTTAGTGTTAGAAAGTAAGCTT

- ou l'enchaînement (II) de nucléotides suivant:

AACGCATGATTGATTGCAGAAGGAGTGGTGCCCCAGTCTTCGTGAATTTTAAAGCCAATC GCACCGGCTT-
10 CAATTTGATCGGCTAAGCTCGCATCGTTAGAAGCGTTACCTTTAGCCAAG AAACCTAAATTCATAGAA-
TATTCTTCAGCCGCTCTGAGCATCCATTTTAAATTTCTTCTG COTGGAGTGATAGTAGTCGCATTAGTGC-
CATCAGCAGGACCGGTTCCACCACCAATCATG GTTGTTACACCGCTTCGAAAAGCTGTAGG-
GATTTGTTGGGGTGAATGAAGTGGATGTGT GTGTCAATACCACCAGCCGTTACGATCAAACCTT-
CACCGGCTAAGGCTTCAGTAGCAGGA
15 CCTACGCTAAGATTGTTTTAACGCCATCTTGCATGTCTTTGTTACCGCCTTTACCAATG CCAGC-
GATTTTGCCATCTTAAATACCAATATCCGCTTTATAAATACCGGTGTAATCCAG ATTAAAGCGTTAGTGA-
TAATTAATCCAATCTTCTTTGCTAGGGTTGTTAGATTGGCTC ATGCCTTCTCTTAGGGGTTTTACCGC-
CACCGAATTTAAGCTCTTCGCCATAAATGGTGTA GTCATGTTCTACTTCAGCGATCAAGTCTGATCGCC-
CAATCTCACTTTATCGCCTGTAGTA

20 GGACCATACATAGAAACATATTCTTTTCTGCTAATCTTTTTCATTTCTTACTCCTTAATT GTTTTTACA-
TAGTTGTCATCGCTTTTAGG

ou l'enchaînement (IIbis) de nucléotides suivant:

CCTAAAAGCGATGACAACTATGTA AAAACAATTAAGGAGTAAGAAATGAAAAAGATTAGC AGAAAAGAA-
TATGTTCTATGTAGGTCTACTACAGGCGATAAAGTGAGATTGGGCGAT CAGACTTGATCGCTGAAGTA-
25 GAACATGACTACACCATTTATGGCGAAGAGCTTAAATTCG GTGGCGGTAAACCCCTAAGAGAAGGCAT-
GAGCCAATCTAACAACCCTAGCAAAGAAGAG TTGGATTTAATTACTACTAACGCTTTAATCGTGATT-
CACCGGTATTTATAAAGCGGAT
ATTGGTATTAAGATGGCAAATCGCTGGCATTGGTAAAGGCGGTAACAAAGACATGCAA GATGGCGT-
TAAAAACAATCTTAGCGTAGGTCCTGCTACTGAAGCCTTAGCCGGTGAAGGT TTGATCG-
30 TAACGGCTGGTGGTATTGACACACACATCCACTTCATTTACCCCAACAAATC CCTACAGCTTTTC-
GAAGCGGTGTAACAACCATGATTGGTGGTGGAACCGGTCTGCTGAT GGCATAATGCGACTACTAT-
CACTCCAGGCAGAAGAAATTTAAATGGATGCTCAGAGCG GCTGAAGAATATTCTATGAATT-
TAGGTTTCTTGGCTAAAGGTAACGCTTCTAACGATGCG AGCTTAGCCGATCAAATTGAAGCCGGTGC-
GATTGGCTTTAAATTCACGAAGACTGGGGC ACCACTCCTTCTGCAATCAATCATGCGTT

35 - ou les enchaînements de nucléotides complémentaires respectivement des enchaînements (I) (II) et (IIbis) sus-mentionnés.

Des séquences de nucléotides selon l'invention, sont caractérisées en ce qu'elles comprennent les enchaînements de nucléotides définis ci-dessus ou sont constituées au moins par une partie de ces enchaînements.

40 Il va de soi que les bases des séquences de nucléotides considérées peuvent être dans un ordre différent de celui trouvé dans les gènes et/ou que ces bases peuvent être, le cas échéant, substituées, dès lors qu'une sonde élaborée à partir de telles séquences donne une réponse caractéristique et non équivoque quant à la capacité de reconnaître la présence de gènes codant pour la protéine à activité uréase de *C.pylori*.

45 Toute séquence de nucléotides hybridable avec celle des enchaînements de nucléotides sus-mentionnés telle qu'obtenue par transcription enzymatique inverse de l'ARN correspondant ou encore par synthèse chimique, entre également dans le cadre de l'invention.

L'invention concerne également une séquence de nucléotides correspondant, selon le code génétique universel, à au moins une partie de la séquence en acides aminés suivante:

50 KLLGVLVGYQKSKNALSSQAIVATNMSNLALKEYLKSQDLELKHCAIGDKFVSECMLNK ANFGGEQSGHIIFS-
DYAKTGDGLVLCALQVSALVLESL

L'invention a également pour objet une séquence de nucléotides correspondant, selon le code génétique universel, à au moins une partie de la séquence en acides aminés (IV) suivante (codée par la séquence nucléotidique (IIbis))

55 NMTPPFMAKSLNSVAVKPLREGMSQSNNPSKEELDIITNALIVDYTG IYKADIGIKDGK IA-
GIGKGGNKDMQDGVKNNLSVGPATEALAGEGLIVTAGGIDTHIFSPQQIPTAFRSG VTTMIGGGTGPADGT-
NATTITPGRRLKWLRAAEEYSMNLGFLAKGNASNDASLADQIE AGAIGFKIHEDWGTTPSAINHA

L'invention se rapporte également aux vecteurs recombinants d'expression et de clonage, capables de

transformer une cellule hôte appropriée, comportant au moins une partie d'une séquence de nucléotides telle que définie ci-dessus sous le contrôle d'éléments de régulation permettant son expression.

Des vecteurs recombinants préférés renferment au moins une partie de la séquence d'environ 4,2kb évoquée plus haut.

- 5 Les souches de micro-organismes transformées entrent également dans le cadre de l'invention. Ces souches comportent l'une des séquences de nucléotides définies ci-dessus ou encore un vecteur recombinant tel que défini précédemment.

La souche *E.coli* S17-1 déposée le 16 Août 1988 sous le n° I-795 à la Collection Nationale de Culture de Microorganismes (C.N.C.M.) de l'Institut Pasteur à PARIS (France) porte le plasmide pILL590 de 16,3kb
10 environ qui comprend le fragment de restriction d'environ 8kb EcoRI (ClaI, BamHI)-PstI (Hind III) évoqué plus haut.

L'invention vise en outre une protéine présentant une activité uréase du type de celle exprimée naturellement chez *C.pylori* ainsi que les fragments peptidiques de cette protéine.

- La protéine de l'invention, et ses fragments, correspondent selon le code génétique universel, aux
15 séquences de nucléotides définies ci-dessus, en particulier à au moins une partie de la séquence d'environ 4,2kb.

La protéine de l'invention est également caractérisée en ce qu'il s'agit d'une protéine telle qu'obtenue par transformation de cellules hôtes au moyen d'un vecteur recombinant comme défini ci-dessus, mise en culture, dans un milieu approprié, des cellules hôtes transformées et récupération de la protéine à partir de
20 ces cellules ou directement à partir du milieu de culture. La production d'uréase ou de fragments de cette dernière par ce procédé, fait également partie de l'invention.

La protéine de l'invention et ses fragments, qui peuvent être également obtenus par synthèse chimique, présentent avantageusement un degré de pureté élevé et sont utilisés pour former, selon les techniques classiques, des anticorps polyclonaux.

- 25 De tels anticorps polyclonaux, ainsi que les anticorps monoclonaux capables de reconnaître spécifiquement la protéine ci-dessus et ses fragments sont également visés par l'invention.

Les séquences de nucléotides définies ci-dessus sont obtenues selon les techniques classiques du génie génétique par clonage et identification des gènes responsables de la synthèse d'une protéine à activité uréase chez *C.pylori*.

- 30 L'invention vise également les applications biologiques des séquences de nucléotides, des protéines correspondantes et des anticorps monoclonaux ou polyclonaux.

Ces applications comprennent l'élaboration, à partir de fragments intragéniques, de sondes pour la détection de *C.pylori*. Cette élaboration comprend, notamment, la dénaturation des séquences double-brin pour obtenir une séquence monobrin utilisable en tant que sonde.

- 35 Les essais réalisés avec de tels fragments pour détecter la présence éventuelle de séquences complémentaires chez divers *Campylobacter* et chez des microorganismes appartenant à des genres différents ont mis en évidence la grande spécificité de ces fragments.

L'invention vise donc des sondes de détection caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une partie d'une séquence de nucléotides définie ci-dessus.

- 40 Toute sonde ne se distinguant de la précédente, au niveau de sa séquence de nucléotides, que par des substitutions ou altérations de nucléotides n'entraînant pas de modification de ses propriétés d'hybridation avec le génome de *C.pylori*, entre dans le cadre de l'invention.

Le fragment d'ADN utilisé comme sonde comporte un nombre de nucléotides suffisant pour obtenir la spécificité requise et la formation d'un hybride stable.

- 45 Il est possible d'utiliser des fragments atteignant plusieurs kb, des résultats de haute spécificité étant cependant également obtenus avec des fragments plus courts d'environ 25 à 40 nucléotides.

Des sondes appropriées pour ce type de détection sont avantageusement marquées par un élément radio-actif ou tout autre groupe permettant sa reconnaissance à l'état hybridé avec la préparation renfermant l'ADN à étudier.

- 50 Selon les techniques classiques, ces sondes sont mises en contact avec un échantillon biologique renfermant des bactéries, ou directement avec ces bactéries ou leurs acides nucléiques, dans des conditions autorisant l'hybridation éventuelle de la séquence de nucléotides de la sonde avec une séquence complémentaire, éventuellement contenue dans le produit testé.

On peut, par exemple, mettre en oeuvre la méthode d'hybridation sur taches. Cette méthode comporte
55 après dénaturation de l'ADN préalablement obtenu à partir de bactéries provenant de biopsies antrales, le dépôt d'une quantité aliquote de cet ADN sur des membranes de nitrocellulose, l'hybridation de chaque membrane dans les conditions usuelles avec la sonde et la détection, de manière classique, de l'hybride formé.

On peut aussi utiliser une méthode d'hybridation sur réplique, selon la technique de Southern. Cette méthode comprend la séparation électrophorétique en gel d'agarose des fragments d'ADNs engendrés après traitement de l'ADN par des enzymes de restriction, le transfert après dénaturation alcaline sur des membranes appropriées et leur hybridation avec la sonde dans les conditions usuelles. Il n'est pas toujours
 5 nécessaire de procéder à l'expression préalable de l'ADN. Il suffit que l'ADN soit rendu accessible à la sonde.

La détection pour l'identification spécifique des C.pylori peut être également réalisée par des techniques d'amplification de l'ADN (PCR). Ces techniques sont décrites en particulier dans les brevets US.4683202 et 4683195 au nom de Cetus Corporation.

10 Pour la mise en oeuvre de ces techniques, on utilise deux amorces de 10 à 40 nucléotides, avantageusement d'environ une vingtaine de nucléotides, ces amorces étant comprises dans l'une des séquences de nucléotides définies ci-dessus ou susceptibles de s'hybrider avec une partie d'une des séquences nucléotidiques définies ci-dessus, ou de leurs séquences complémentaires. De manière avantageuse, ces amorces sont distantes d'environ 200 à 250 nucléotides lorsqu'elles sont hybridées (ou liées),
 15 aux brins de l'ADN à amplifier. l'une des séquences est capable de se lier à une séquence de nucléotides d'un des brins de fragments d'ADN à amplifier, cette séquence étant située au niveau d'une extrémité de ce fragment (par exemple l'extrémité 5') ; l'autre séquence est capable de se lier à une séquence de nucléotides du deuxième brin du fragment d'ADN à amplifier, cette dernière séquence étant située au niveau de l'extrémité de ce fragment opposée à celle sus-mentionnée (cette dernière extrémité étant
 20 encore désignée par extrémité 3' dans l'exemple proposé).

Des amorces préférées sont comprises dans la séquence de nucléotides du fragment de restriction H2-H3 de la figure 2, et sont distantes d'environ 200 à 250 nucléotides.

Il s'agit, en particulier, des fragments respectivement à chaque extrémité de cette séquence de restriction HindIII-HindIII.

25 Un procédé de dépistage in vitro de la présence éventuelle de C.pylori dans un échantillon biologique comprend les étapes suivantes:

- éventuellement l'amplification préalable de la quantité de séquences de nucléotides susceptibles d'être contenues dans l'échantillon, par mise en contact de cet échantillon avec des amorces telles que décrites ci-dessus, ces amorces étant susceptibles respectivement de se lier d'une part à l'extrémité 5' d'un brin de
 30 ladite séquence de nucléotides et d'autre part, à l'extrémité 3' de l'autre brin de ladite séquence de nucléotides, cette mise en contact étant suivie d'une étape d'amplification génique en présence d'une ADN polymérase et des quatre nucléosides triphosphates dATP, dCTP, dGTP, dTTP, ces opérations d'hybridation des amorces et d'amplification génique étant répétées plusieurs fois.

- la mise en contact de l'échantillon biologique en question avec une sonde nucléotidique selon l'invention,
 35 dans des conditions permettant la production d'un complexe d'hybridation formé entre la sonde et la séquence de nucléotides.

- la détection du complexe d'hybridation.

L'invention fournit ainsi des outils permettant de détecter rapidement C.pylori, in situ, et dans l'environnement avec une grande spécificité, sans avoir à pratiquer de cultures.

40 De tels outils de détection sont particulièrement utiles pour étudier le réservoir naturel de ces bactéries, les méthodes de transmission, de circulation et de contamination. De plus, dans le diagnostic in vitro pratiqué sur les biopsies, l'utilisation de ces sondes permet un gain de temps considérable par rapport aux techniques actuelles qui nécessitent de plus une technologie ne pouvant être réalisée que dans des services spécialisés, à savoir, des techniques bactériologiques ou utilisant la microscopie électronique.

45 Des résultats reproductibles ont été obtenus en utilisant comme sonde intragénique le fragment d'environ 8kb défini ci-dessus.

Compte tenu de leur spécificité à l'égard de C.pylori, ces sondes constituent également un outil de grand intérêt.

Pour étudier le pouvoir pathogène de C.pylori de façon à prévenir l'infection, il est ainsi possible
 50 d'étudier le rôle joué par C.pylori dans le développement des maladies ulcéreuses et d'identifier les déterminants génétiques qui semblent impliqués dans le pouvoir pathogène de cet organisme en vue de créer in vitro des mutants isogéniques de C.pylori, c.a.d. des bactéries modifiées génétiquement dans chacun des déterminants qui semblent jouer un rôle dans la pathogénèse de l'infection, mutants qui pourront être testés dans des modèles animaux.

55 L'invention concerne également la détection du polymorphisme des gènes codant pour l'uréase chez C.pylori à l'aide des sondes nucléotidiques définies ci-dessus et d'enzymes de restriction appropriées. Les conditions dans lesquelles cette détection est réalisée sont plus particulièrement décrites dans l'article de Gusella J.F. dans J. of Clin. - investigations (1986), 77, 1723-1726.

L'invention vise également les applications immunologiques de la protéine codée, plus spécialement pour l'élaboration d'antisérum spécifique ainsi que d'anticorps polyclonaux et monoclonaux. Les anticorps polyclonaux sont formés selon les techniques classiques par injection de la protéine à des animaux, récupération des antisérums, puis des anticorps à partir des antisérums par exemple par chromatographie d'affinité.

Les anticorps monoclonaux sont produits de manière habituelle en fusionnant des cellules myélomes avec des cellules de rate d'animaux préalablement immunisés à l'aide des protéines de l'invention.

L'invention vise, en outre, un procédé de dépistage *in vitro* de la présence éventuelle de *C.pylori* dans un échantillon biologique susceptible de le contenir. Ce procédé est caractérisé en ce qu'il comprend:

- la mise en contact de l'échantillon avec un anticorps selon l'invention, dans des conditions permettant la production d'un complexe immunologique formé entre tout ou partie de la protéine à activité uréase produite par *C.pylori* et cet anticorps, et
- la détection du complexe immunologique.

Pour la mise en oeuvre des méthodes de dépistage *in vitro*, considérées ci-dessus basées sur l'utilisation de sondes nucléotidiques, on a recours avantageusement à des nécessaires ou kits comprenant:

- le cas échéant, au moins un couple d'amorces selon l'invention,
- une quantité déterminée d'une sonde nucléotidique selon l'invention,
- avantageusement, un milieu approprié respectivement à la formation d'une réaction d'hybridation entre la séquence à détecter et la sonde.

- avantageusement des réactifs permettant la détection des complexes d'hybridation formés entre la séquence de nucléotides et la sonde lors de la réaction d'hybridation.

Pour la mise en oeuvre des méthodes de dépistage *in vitro* définies ci-dessus, basées sur l'utilisation d'anticorps on aura recours avantageusement à des nécessaires ou kits, comprenant:

- une quantité déterminée d'un anticorps selon l'invention,
- avantageusement un milieu approprié à la formation d'une réaction immunologique entre au moins une partie de la protéine à activité uréase produite par une souche de *C.pylori* et l'anticorps,
- avantageusement, des réactifs permettant la détection des complexes immunologiques formés entre au moins une partie de la protéine à activité uréase et l'anticorps lors de la réaction immunologique.

Une étude approfondie du fragment de 4.2kb défini ci-dessus a permis de situer les gènes de structure codant pour les sous-unités polypeptidiques majeures de l'uréase de *C.pylori*.

Cette étude a été réalisée en construisant des mutants dans les plasmides recombinants introduits chez *E.coli* et *C.jejuni* incapables de synthétiser l'uréase, (Baskerville-A, Newell D. (1988), Gut, 29, 465-472). Le système de transcription-traduction *in vitro* d'*E.coli* ainsi qu'un système d'expression en minicellules ont été utilisés afin d'identifier et de localiser, au sein du fragment de 4.2kb de *C.pylori*, l'ensemble des gènes codant pour les sous-unités de l'uréase: deux protéines majeures de 26kDa et 61kDa ont été identifiées. Parallèlement, après diverses délétions au sein du fragment de 4.2kb, un système de transfert par conjugaison d'une souche d'*E.coli* à *C.jejuni* (du type de celui explicité dans la description détaillée qui suit) a été utilisé pour identifier les régions indispensables à l'expression de l'activité uréasique et corréler la délétion d'une région avec la disparition d'un polypeptide et la perte de l'activité uréasique. Il a été ainsi déterminé que les gènes codant pour les deux polypeptides nécessaires à l'expression de l'activité uréasique se situent dans la région centrale de 0.35kb, en aval du site H3 de la figure 2, et à cheval sur B1. La transcription des gènes codant pour les polypeptides de 61kDa ou de 26kDa se fait dans le sens EcoRI-PstI. Le fragment de 3.35kb est nécessaire mais non suffisant à l'expression de l'activité uréasique chez *C.jejuni*. Une région adjacente de 0.85kb, située en amont et apparemment non associée à l'expression de polypeptides chez *E.coli*, est indispensable à l'expression de l'activité uréasique chez *C.jejuni*.

L'analyse des mutants de délétion par transcription-traduction *in vitro* a permis d'observer que les deux polypeptides de 26 et 61kDa sont codés par deux fragments d'ADN adjacents.

La présente invention a pour objet tout ou partie de la séquence nucléotidique (V) suivante :

1
 ATGAAACTCAOOCCAAAAGAGTTAGATAAGTTGATGCTOCTAOGCTGGAGAATTGGCT
 5
 AAAAAAGCAAGCAAAAAGGCATTAGCTTAAGCTATGTAGAGCAGTAGCTTTGATTAGT
 GOCATATTATGGAGAGOGAGAGCTGGTAAAAAGACTGOGGCTGAATTGATGCAAGAA
 10
 GGGOGCACTCTTTTAAAACAGATGATGTGATGGATGGOGTGGCAAGCATGATOCATGAA
 GTGGGTATTGAAGGATGTTTCTGATGGGACTAACTOGTAAOOGTGCATAOOCTATT
 GAGGOCATGGTAAATTAGTTCTGGTGAGTTGTTCTTAAAAAATGAAGACATCACTATC
 15
 AAGCAAGGCAAAAAGOOGTAGOGTGAAAGTTAAAAATGTTGGOGACAGAOOGGTTCAA
 ATOGGCTCACACTTCCATTCTTTGAAGTGAATAGATGOCTAGACTTTGACAGAGAAAA
 20
 ACTTTGGGTAAAGCTTAGACATTGOGAGOGGGACAGOGGTAGATTGAGCTGGOGAA
 GAAAAATOGTGAATTGATTGACATTGGOGGTAAACAGAGAATCTTTGGATTTAAGCA
 TTGGTTGATAGACAAGCAGACAAGCAAGCAAAAAAATTGCTTTACAGAGCTAAAGAG
 25
 OGTGGTTTTTCATGGOGCTAAAAGOGATGACAACCTATGTAAAAACAATTAAGGAGTAA

717

L'invention a plus particulièrement pour objet toute séquence nucléotidique correspondant, selon le
 30 code génétique universel à au moins une partie de la séquence en acides aminés (VI) de 26kDa (codée par
 la séquence nucléotidique (V)) suivante:

1
 35 MKLTPKELDKMLHYAGELAKKRKEKGIKLNVEAVALISAHIMEEARAGKKTAAELMOE
 GRTLLKPDVMDGVASMIHEVGIEAMFPDGTKLVTVHTPIEANGKLVPGELFLKNEDITI
 NEGKAVSVKKNVGRFPVQIGSHFHFEEVNRCLDFDREKTFGRDLASGTAVRFEPEE
 40
 EKSVELIDIGNRRIFGFNALVDROADNESKKIALFRAKERGFHAKSDDNVKTKE

739

45 239 acides aminés
 Poids moléculaire : 26.522 daltons

L'invention a également pour objet toute ou partie de la séquence nucléotidique (VII) suivantes:

50

55

1
 ATGAAAAGATTAGCAGAAAAGATAATGTTTCTATGATGGTCTACTACAGGOGATAA
 5 GTGAGATTGGGOGATACAGACTTGATGGCTGAAGTAGACATGACTACACATTATGGC
 GAAGAGCTTAAATTGGTGGGGTAAACOOCTAAGAGAGGCATGAGCCAATCTAACAC
 OCTAGCAAAGAAGAGTTGGATTTAATTATCACTAAAGCTTAAATGGTGGATTACAOGGT
 10 ATTTATAAAGOGGATATTGGTATTAAAGATGGCAAAATGGCTGGCATTGGTAAAGGGGT
 AACAAAGACATGCAAGATGGGGTTAAAAACAATCTTAGGGTAGGTCTGCTACTGAAGOC
 TTAGOOGGTGAAGGTTTGATGGTAAGGGCTGGTGGIATTGACACACACATOCACCTCATT
 TCACOOCAACAAATOOCTACAGCTTTTGCAAGGGGTGTACAACCATGATTGGTGGTGA
 15 ACOGGTCTGCTGATGGCACTAATGOGACTACTATCACTOCAGGCAGAGAAATTAAAA
 TGGATGCTCAGAGGGCTGAAGAATATTCTATGAATTTAGGTTTCTTGGCTAAAGGTAC
 GCTTCTAAGATGOGAGCTTAGOOGATCAAATTGAAGOOGGTGGGATTGGCTTTAAATTT
 20 CAGAGACTGGGGCAOCCACTOCTTCTGCAATCAATCTGGGTAGATGTTGOGGACAA
 TAGATGTGCAAGTGGCTATOCACACAGACACTTTGATGAAGOOGGTGTGTAGAGAC
 ACTATGGCTGCTATTGCTGGAGGCCTATGCACACTTTTCCACTGAAGGOGCTGGGSC
 25 GGACAGCTOCTGATATTATTAAAGTAGOOGGTGAACACACATTCTTCCOOGCTTCCACT
 AAOCOCACATOOCTTTCAOOGTGAATACAGAAGCAGGCACATGGACATGCTTATGGTG
 TGOCAOCCACTTGGATAAAAGCATTAAAGAAGATGTTGAGTGGCTGATTCAAGGATOOGC
 30 OCTCAAACCATTGGGGCTGAAGACACTTTGCAATGACATGGGGATTTTCTCAATCAOAGT
 TCTGACTCTCAAGOGATGGGOOGTGTGGGTGAAGTTATCACTAGACTTGGCAACAGCT
 GACAAAAACAAGAAAGAAATTTGGOOGCTTGAAGAAGAAAAAGGOGATAAGACAACCTC
 35 AGGATCAAAGCTACTTGTCTAAATAACCATTAACOCAGOGATGGCTCATGGGATTAGC
 GAGTATGTAGGTTCACTAGAAGTGGGCAAGTGGCTGACTTGGIATTGTGGAGTCCAGCA
 TTCTTTGGOGTGAACOCACATGATCATCAAGGOGGATTCAATTGOGTTAAGOCAAATG
 40 GOGATGOGAAOGCTTCTATOOCTAOCOCACAACOGGTTTATTACAGAGAAATGTTGGCT
 CATCATGGTAAAGCTAAATAOGATGCAACATCACTTTTGTGTCTCAAGOGGCTTATGAC
 AAAGGCATTAAAGAAGAATTAGGACTTGAAGACAAGTGTGGOOGGTAAAAAATTGCAGA
 45 AATATCACTAAAAAGACATGCAATTCAAGACACTACTGCTCATTGAAGTCAATCT
 GAACTTAOCATGTGTTGGTGGATGGCAAGAAGTAACTTCTAAACAGOCAATAAAGTG
 AGCTTGGOGCACTCTTTAGCATTCTTAG

1710

50

L'invention a plus particulièrement pour objet toute séquence nucléotidique correspondant, selon le code génétique universel à au moins une partie de la séquence en acides aminés (VIII) de 61kDa (codée par la séquence nucléotidique (VII)) suivante:

55

1
 MKKISPKKEYVSMYGPPTGDKVRLGDTDLAEVEHDYTTYGEEIKFGGGKTLREGM
 5 SQSNPNPSKEELDIITNALIVDYTGMYKADIGIKDGKAGIGKGGNKDMQDGVKNN
 LSVGPATEALAGEGLVITAGGIDTHIHFISSPQQIPTAFASGVTTMIGGGTGPAD
 GTNATTTTPGRRNLKWMRLRAAEYSMNLGFLAKGNASNDASLADQIEAGAGF
 10 KIHEDWGTTPSAINHALDVADKYDVQVAIHTDTLNEAGCVEDTMAAAGRTMH
 TFHTEGAGGGHAPDIIKVAGEHNILPASTNPTIPFTVNTAEHMDMLMVCHLD
 15 KSIKEDVQFADSRIRPQTAAEDTLHDMGIFSTSSDSQAMGRVGEVITRTWQT
 ADKNKKEFGRLKEEKGDNDNFRIKRYLSKYTINPAIAHGISEYVGSVEVGKVADL
 20 VLWSPAFFGVKPNMIKGGFIALSQMGDANASPTQPVPYYREMFHHGKAKYD
 ANITFVSQAAYDKGIKEELGLERQVLPVKNCRNTKKDMQFNDTAAHIEVNPETY
 25 HVFVDGKEVTSKPANKVSLAQLFSIF_

569

569 Acides aminés

Poids moléculaire : 61 729 daltons

30 La comparaison de la séquence en acides aminés VIII avec celle de l'uréase d'haricot (Jack Bean) décrit notamment dans Eur. J. Biochem 175, 151-165 (1988), montre de façon inattendue un haut niveau d'homologies d'acides aminés. Cette conservation de structure a permis aux inventeurs de déduire le site actif de la sous-unité uréasique de 61kDa qui est compris, en totalité ou en partie, dans la séquence polypeptidique délimitée par les acides aminés situés aux positions 206 et 338 de la séquence VIII décrite ci-dessus.

35 L'invention vise également toute ou partie de la nucléotidique IX constituée successivement de la séquence V et de la séquence VII.

40 L'invention se rapporte également à toute séquence séquence nucléotidique correspondant, selon le code génétique universel à au moins une partie de la séquence en acides aminés (X) de 87kDa constituée successivement de la séquence VI et de la séquence VIII.

L'invention concerne également des sondes de détection de la présence éventuelle de C.pylori dans un échantillon biologique, caractérisée en ce qu'elles comprennent au moins une partie d'une séquence de nucléotides définies ci-dessus.

45 Il va de soi que les bases des séquences de nucléotides considérées peuvent être dans un ordre différent de celui trouvé dans les gènes et/ou que ces bases peuvent être, le cas échéant, substituées, dès lors qu'une sonde élaborée à partir de telles séquences donne une réponse caractéristique et non équivoque quant à la capacité de reconnaître la présence de gènes codant pour la protéine à activité uréase de C.pylori.

50 Toute séquence de nucléotides hybridable avec celle des enchaînements de nucléotides sus-mentionnés telle qu'obtenue par transcription enzymatique inverse de l'ARN correspondant ou encore par synthèse chimique, entre également dans le cadre de l'invention.

Toute sonde ne se distinguant de la précédente, au niveau de sa séquence de nucléotides, que par des substitutions ou altérations de nucléotides n'entraînant pas de modification de ses propriétés d'hybridation avec le génome de C.pylori, entre dans le cadre de l'invention.

55 Les sondes sus-mentionnées sont utilisables dans des procédés de diagnostic in vitro de la présence éventuelle de C.pylori dans un échantillon biologique décrits ci-dessus.

L'invention a également pour objet des amorces nucléotidiques d'environ 10 à environ 40 nucléotides, ces amorces étant comprises dans l'une des séquences nucléotidiques V ou VII définies ci-dessus (ou dans

l'une des séquences dérivées de ces séquences V et VII), ou étant susceptibles de s'hybrider avec une partie d'une des séquences nucléotidiques sus-mentionnées ou avec leurs séquences complémentaires (notamment dans les conditions d'hybridation définies ci-dessus).

L'invention concerne également l'utilisation de ces amorces dans les méthodes de diagnostic *in vitro* définies ci-dessus, pour l'amplification préalable de la quantité de nucléotides de C.pylori susceptibles d'être contenus dans l'échantillon biologique selon le procédé décrit ci-dessus.

L'invention se rapporte également aux vecteurs recombinants d'expression et de clonage, capables de transformer une cellule hôte appropriée comportant toute ou partie d'une séquence nucléotidique identique ou dérivée des séquences nucléotidiques V, VII et IX sus-mentionnées.

L'invention vise également un procédé de production de protéines correspondant à toute ou partie des séquences VI, VIII et X sus-mentionnées, ce procédé comprenant la transformation de cellules hôtes appropriées (notamment celles décrites ci-dessus) à l'aide des vecteurs sus-mentionnés et la récupération des protéines ainsi produites suivie, le cas échéant, par une étape de purification de ces protéines.

La procédure de production de protéines défini ci-dessus comprend le cas échéant une étape préalable d'amplification de gène codant pour la protéine dont la production est recherchée, cette étape étant réalisée à l'aide de couples d'amorces de l'invention selon le procédé décrit ci-dessus.

L'invention a également pour objet les polypeptides (ou protéines) codés par les séquences nucléotidiques décrites ci-dessus. En particulier l'invention vise la séquence en acides aminés X de 87kDa, la séquence VI de 26kDa, et la séquence VIII de 61kDa décrites ci-dessus ainsi que leurs fragments.

L'invention concerne également les anticorps polyclonaux et monoclonaux obtenus à partir de toutes ou partie des polypeptides décrits ci-dessus et susceptibles de former un complexe immunologique avec eux.

L'invention vise particulièrement les anticorps, notamment monoclonaux, obtenus à l'aide d'une séquence peptidique d'au moins environ 10 à 15 acides aminés de la séquence VI, ou de la séquence VIII.

Des anticorps monoclonaux préférés de l'invention sont dirigés contre toute ou partie de la séquence délimitée par les acides aminés situés aux positions 206 et 338 de la séquence VIII, et plus particulièrement ceux obtenus à l'aide d'une séquence peptidique d'au moins environ 10 à 15 acides aminés issue de la séquence délimitée par les acides aminés situés aux positions 206 et 338 de la séquence VIII.

L'invention a également pour objet l'utilisation des anticorps sus-mentionnés pour la mise en oeuvre de méthodes de diagnostic *in vitro* ainsi que dans des kits de diagnostic *in vitro* de l'infection d'un individu par C.pylori tels que décrits ci-dessus.

L'invention vise également des compositions immunogènes comprenant toute ou partie des polypeptides décrits ci-dessus, et plus particulièrement, toute ou partie de la séquence polypeptidique délimitée par les acides aminés situés aux positions 206 et 338 de la séquence VIII, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

De telles compositions immunogènes sont utilisables en tant que compositions de vaccin pour la prévention de l'infection d'un individu par C.pylori.

L'invention concerne également des compositions pharmaceutiques comprenant un (ou plusieurs) anticorps tels que décrits ci-dessus, et plus particulièrement des anticorps susceptibles de former un complexe immunologique avec toute ou partie de la séquence peptidique délimitée par les aminés situés aux positions 206 et 338 de la séquence VIII, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

De telles compositions pharmaceutiques selon l'invention sont utilisables par le traitement des pathologies liées à l'infection d'un individu par C.pylori, notamment des gastrites, et des ulcères gastriques et duodénaux.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention sont rapportés dans la description qui suit concernant le clonage des gènes responsables de la production de la protéine à activité uréase chez C.pylori, le séquençage de la région associée à l'expression de la protéine à activité uréase et la spécificité de sondes nucléotidiques pour la détection de C.pylori.

Dans cette description, on se réfère aux figures 1 et 2 qui représentent:

- la figure 1, la carte de restriction d'un fragment PstI-EcoRI du cosmide recombinant IID2 portant l'information requise pour l'expression de l'uréase chez C.jejuni, et
- la figure 2, la carte de restriction d'un fragment d'environ 8kb de pILL590.

1) Réalisation d'une banque génomique dans un vecteur cosmique navette; clonage des gènes impliqués dans la production de l'uréase chez C.pylori.

L'ADN chromosomique de la souche C.pylori (85P) est préparé de façon à générer des fragments

d'ADN de haut poids moléculaire; environ 300µg de cet ADN chromosomique sont soumis à une digestion partielle contrôlée par l'endonucléase de restriction Sau3A et déposés sur gradient de sucrose de façon à isoler sélectivement des fragments de digestion compris entre 35 et 45 kilobases. 1.5µg de ces fragments sont ligaturés in vitro au vecteur navette-cosmide pILL575 linéarisé par l'endonucléase BamHI et déphosphorylé. pILL575 a été construit à partir du cosmide navette pILL550 décrit par Labigne-Roussel et al. dans J. Bacteriol. 169:5320-5323, 1987, dans lequel a été inséré le site "cos" du phage lambda (fragment Bgl II de 1.7kb de pERG153 inséré au site Pvu II de pILL550); il est donc comme lui mobilisable par conjugaison, code pour une résistance à la kanamycine qui s'exprime à la fois chez E.coli et Campylobacter (Km^r) et se réplique à la fois chez E.coli et chez C.jejuni du fait de la présence de deux origines de réplication, l'une fonctionnelle chez E.coli exclusivement l'autre uniquement chez Campylobacter. Les produits de cette ligation sont empaquetés in vitro dans les particules de lambda puis introduits par transfection dans une souche de E.coli hébergeant un plasmide IncP capable de compléter en trans les fonctions de transfert des cosmides recombinants. Les colonies de E.coli infectées et résistantes à la kanamycine sont immédiatement conservées individuellement à -80 °C; une banque génomique cosmique représentative de l'ensemble du génome de Campylobacter pylori est réalisée chez E.coli en conservant environ 500 clones indépendants.

Chacun des cosmides recombinants est alors transféré par conjugaison d'E.coli à une souche réceptrice de Campylobacter jejuni C31, naturellement uréase.

On vérifie pour chacun de ces transconjugants résistants à la kanamycine, s'il y a synthèse par Campylobacter jejuni d'une uréase.

On isole un cosmide sur 106 analysés portant une information génétique conférant à Campylobacter jejuni C31 la capacité de produire une uréase. Le cosmide recombinant (IID2) a une taille de 54 kilobases. La position relative des sites de clivage par les endonucléases de restriction PstI, BamHI, SmaI et EcoRI sur cette séquence est présentée sur la figure 1.

2) Identification du ou des gènes requis pour la production d'uréase chez Campylobacter pylori.

On effectue le sous-clonage des gènes uréases en réalisant à partir de l'ADN cosmique IID2 préparé chez E.coli des digestions partielles par l'endonucléase Sau3A de façon à générer des fragments de digestions partielles allant de 8 à 15 kilobases. On recherche le plus petit plasmide hybride cloné chez E.coli conférant l'aptitude à produire une uréase après son transfert par conjugaison à Campylobacter récepteur.

4 plasmides sur 37 testés portent l'information nécessaire à l'expression de l'uréase chez Campylobacter jejuni: pILL586, pILL589 et pILL590 (cf. figure 2).

Par comparaison des cartes de restriction de ces quatre hybrides, on constate la présence d'une séquence de nucléotides de 4,2 kilobases commune aux quatre hybrides, suggérant qu'il s'agit là de la région requise pour l'expression de l'uréase. Un certain nombre de délétions ont été réalisées qui confirment ces conclusions (cf. figure 2).

Le fragment EcoRI-Pst I de pILL590 a été utilisé comme sonde dans des hybridations avec l'ADN total de C.pylori 85P en vue de s'assurer que les différents fragments de restrictions générés avec BamHI et HindIII à partir de pILL590 étaient présents dans 85P. Les résultats obtenus montrent que la séquence de 8kb présente dans pILL590 n'a pas subi de réarrangements au cours des différentes étapes de clonage.

3) Séquence de nucléotides de la région associée l'expression de l'uréase.

La séquence du fragment HindIII compris entre les sites H2 et H3 correspond à la séquence des 294 nucléotides de l'enchaînement (I).

La séquence suivante de 610 nucléotides de l'enchaînement (II) est interne au fragment défini par les sites H4 et B1 (figure 2).

4) Spécificité des sondes nucléotidiques pour la détection de Campylobacter pylori.

Le fragment EcoRI-PstI de 8kb provenant de pILL590 a été utilisé comme sonde radioactive dans des expériences d'hybridation.

32 Campylobacter pylori ont été testés en hybridation sur colonies et ont donné un signal positif; sur 35

Campylobacter jejuni, fétus et *coli* étudiés aucune n'a donné de signal positif dans des conditions d'hybridation stringentes classiques (50% de formamide, 37°, 3XSSC).

Dans ces mêmes conditions, la sonde *C. pylori* de 8 kilobases n'a pas donné de signal positif avec la liste des microorganismes suivants qui sont tous naturellement des producteurs d'uréase:

- 5 *Klebsiella oxytoca* (3 souches), *Klebsiella pneumoniae* (3 souches), *Proteus mirabilis* (3 souches) *Proteus morganii* (3 souches) *Proteus vulgaris* (2 souches) *Providencia stuartii* (3 souches), *Pseudomonas picketti* (3 souches), *Yersinia enterocolitica* (3 souches), 5 souches d'*Acinetobacter* uréase, 2 souches d'*Escherichia coli* uréase et 3 souches de *Citrobacter freundii* uréase.

10 L'absence de faux positif avec le fragment 8kb garantit la spécificité des sondes nucléotidiques proposées.

Un procédé de préparation d'anticorps comprend:

- l'immunisation d'un animal à l'aide d'un polypeptide ci-dessus défini, et
- la récupération des anticorps formés selon les techniques classiques.

15 Un mode de préparation approprié des acides nucléiques (comportant au maximum 200 nucléotides - ou pb. lorsqu'il s'agit d'acides nucléiques bicaténaires) de l'invention par voie chimique comprend les étapes suivantes:

- la synthèse d'ADN en utilisant la méthode automatisée des bêta-cyanethyl phosphoramidite décrite dans *Bioorganic Chemistry* 4: 274-325, 1986,
- le clonage des ADN ainsi obtenus dans un vecteur plasmidien approprié et la récupération des ADN par

20 hybridation avec une sonde appropriée.

Un mode de préparation, par voie chimique, d'acides nucléiques de longueur supérieure à 200 nucléotides - ou pb (lorsqu'il s'agit d'acides nucléiques bicaténaires) comprend les étapes suivantes:

- l'assemblage d'oligonucléotides synthétisés chimiquement, pourvus à leurs extrémités de sites de restriction différents, dont les séquences sont compatibles avec l'enchaînement en acides aminés du
- 25 polypeptide naturel selon le principe décrit dans *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 80: 7461-7465, 1983.
- le clonage des ADN ainsi obtenus dans un vecteur plasmidien approprié et la récupération de l'acide nucléique recherché par hybridation avec une sonde appropriée.

30 Revendications

1. Séquence de nucléotides, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une partie d'une séquence codant pour une protéine à activité uréase telle qu'exprimée par *C. pylori*.

35 2. Séquence de nucléotides capable de s'hybrider avec des gènes codant pour une protéine à activité uréase telle qu'exprimée chez *C. pylori* dans les conditions suivantes : 68° C, 6 x SSC dans un milieu de Denhardt.

3. Séquence de nucléotides, caractérisée en ce qu'elle porte l'information requise pour la production d'une protéine à activité uréase ou de fragments de cette dernière capables de former un complexe immunologique avec des anticorps respectivement contre la protéine à activité uréase telle qu'exprimée par

40 *C. pylori*, ou contre des fragments de cette dernière.

4. Séquence de nucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle comprend un fragment *EcoRI*(*ClaI*, *BamHI*)-*PstI*(*HindIII*) d'environ 8 kb dont la carte de restriction enzymatique est représentée sur la figure 2.

5. Séquence de nucléotides selon la revendication 4, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins

45 une partie d'un fragment d'environ 4,2 kb ($\pm 5\%$) délimité par les nucléotides d'extrémité situés respectivement à une distance d'environ 0,55 kb en amont du site H2 représenté sur la figure 1, et d'environ 0,7 kb en aval du site B1 représenté sur la figure 2.

6. Séquence de nucléotides recombinante, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, le cas échéant, associée avec un promoteur capable de

50 contrôler la transcription de la séquence et une séquence d'ADN codant pour des signaux de terminaison de la transcription.

7. Séquence de nucléotides, caractérisée en ce qu'elle est capable de s'hybrider avec une sonde nucléotidique formée à partir de la séquence présentant:

- l'enchaînement (I) de nucléotides suivant:

55 AAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTTATCAAAAATCTAAAAACGCCCTTTCTTCTCAAGCA ATTGTCGCTA-
CAAACATGAGCAATTTAGCCCTTAAAGAATACTTAAAATCCCAAGATTTA GAATTGAAGCATTGCGC-
GATTGGGGATAAGTTTGTGAGCGAATGCATGCGATTGAACAAA GCCAATTTTGGAGGCGAG-
CAAAGCGGGCATATCATTTTGTAGCGATTACGCTAAAACCGGC GATGGCTTGGTGTGCGCTTTGCAAGT-

GAGCGCGTTAGTGTTAGAAAGTAAGCTT

- ou l'enchaînement (IIbis) de nucléotides suivant:

CCTAAAAGCGATGACAACTATGTAAAAACAATTAAGGAGTAAGAAATGAAAAAGATTAGC AGAAAAGAA-
 TATGTTTCTATGTATGGTCTACTACAGGCGATAAAGTGAGATTGGGCGAT CAGACTTGATCGCTGAAG-
 5 TAGAACATGACTACACCATTATGGCGAAGAGCTTAAATTCG GTGGCGGTAAAACCCCTAAGAGAAGG-
 CATGAGCCAATCTAACAACCCTAGCAAAGAAGAG TTGGATTTAATTATCACTAACGCTTTAATCGTGGAT-
 TACACCGGTATTTATAAAGCGGAT
 ATTGGTATTAAGATGGCAAAATCGCTGGCATTGGTAAAGGCGGTAAACAAAGACATGCAA GATGGCGT-
 TAAAAACAATCTTAGCGTAGGTCTGCTACTGAAGCCTTAGCCGGTGAAGGT TTGATCG-
 10 TAACGGCTGGTGGTATTGACACACACATCCACTTCATTTCACCCCAACAAATC CCTACAGCTTTTC-
 GAAGCGGTGTAACAACCATGATTGGTGGTGAACCGGTCTGCTGAT GGCCTAATGCGACTACTAT-
 CACTCCAGGCAGAAGAAATTTAAATGGATGCTCAGAGCG GCTGAAGAATATTCTATGAATT-
 TAGGTTTCTTGGCTAAAGGTAACGCTTCTAACGATGCG AGCTTAGCCGATCAAATTGAAGCCGGTGC-
 GATTGGCTTTAAATTCACGAAGACTGGGGC ACCACTCCTTCTGCAATCAATCATGCGTT
 15 - ou l'enchaînement (V) de nucléotides suivant:

¹
 ATGAAACTCAOOC¹AAAGAGTTAGATAAGTTGATGCTOOC¹TAOGCTGGAGATTGGCT
 20 AAAAAAGCAAGAAAAAGGCATTAGCTTAACCTATGTAGAGCAGTAGCTTTGATTAGT
 ,GOOCATATTATGGAAGAGAGAGCTGGTAAAAAGCTGGGCTGAATTGATGCAAGAA
 GGGGGCACTCTTTTAAAAOCAGATGATGTGATGGATGGGTGGCAAGCATGATOCATGAA
 25 GTGGGTATTGAAGCATGTTTCTGATGGGACTAACTOGTAAOOGTGATAOOCTATT
 GAGGOCATGGTAAATTAGTTCTGGTGAGTTGTTCTTAAAAATGAAGCATCACTATC
 30 AAGCAAGCAAAAAAGOOGTTAGOGTGAAAGTTAAAAATGTTGGOGACAGAOOGGTTCAA
 ATOGGCTCACCTTCCATTCTTTGAAGTGAATAGATGOCCTGACTTTGACAGAGAAAA
 35 ACTTTGGTAAOOGCTTAGACATTGOGAGOGGGACAGOGGTAGATTGAGOCTGGOGAA
 GAAAAATOOGTAGAATTGATTGACATTGGOGGTAAAGAGATCTTTGGATTTAAGCA
 40 TTGGTTGATAGACAAGCAGACAAGCAAGCAAAAAATTGCTTTACAGAGCTAAGAG
 OGTGGTTTTCTGGOGCTAAAGOGATGACAACTATGTAAAAACAATTAAGGAGTAA

45 - ou l'enchaînement (VII) de nucléotides suivant:

50

55

1
 ATGAAAAGATTAGCAGAAAGATATGTTTCTATGTATGGTCTACTACAGGOGATAA
 5 GTGAGATTGGGOGATACAGACTTGATGCTGAGTAGACATGACTACACATTATGGC
 GAAGAGCTTAAATTOGGTGGGGGTAAAACCTAAGAGAGGATGAGOCATCTAACAC
 OCTAGCAAGAAGAGTTGGATTATATCACTAAAGCTTTAATOGTGGATTACACGGT
 10 ATTTATAAGOGGATATTGGTATTAAAGATGGCAAAATGCTGGCATTGGTAAAGGGGT
 AACAAAGACATGCAAGATGGGGTTAAAAACAATCTTAGOGTAGGTCTGCTACTGAGOC
 TTAGGOGGTGAAGGTTTGATOGTAAAGGCTGGTGGTATTGACACACATOCACCTTCATT
 TCAOOCAACAATTOOCTACAGCTTTTGCAAGOGGTGTAAACAACATGATTGGTGGTGA
 15 AOOGGTCTGCTGATGGCACTAATGOGACTACTATCACTOCAGGCAGAGAAATTTAAAA
 TGGATGCTCAGAGGGCTGAAGATATTCTATGAATTTAGGTTTCTTGGCTAAAGGTAC
 GCTTCTAAGATGOGAGCTTAGOOGATCAAAATTGAAGOGGTGOGATTGGCTTTAAAT
 20 CAGAGACTGGGGCAOACTOCTTCTGCAATCAATCATGOGTTAGATGTTGOGGACAA
 TAGATGTGCAAGTGGCTATOCACACAGACACTTTGATGAAGOGGTGTGTAGAGAC
 ACTATGGCTGCTATGCTGGAAGCCTATGCACTTTTCCACTGAGGOGCTGGGGC
 25 GGCAGGCTOCTGATATTATTAAAGTAGOOGGTGAACACACATTCTTTOOGCTTCCACT
 AAOOCAOATOOCTTTCAOOGTGAATACAGAGCAGGCATGGACATGCTTATGGTG
 TGGCAOACTTGGATAAAAGCATTAAAGAAGATGTTGAGTGGCTGATTCAAGGATOGC
 30 OCTCAAOCATTGOGGCTGAAGACACTTTGCATGACATGGGGATTTTCTCAATCACAGT
 TCTGACTCTCAAGGATGGGOGGTGTGGGTGAAGTTATCTAGAACTTGGCAACAGCT
 GACAAAACAAGAAAGATTTGGGOGCTTGAAAGAAGAAAAGGOGATAAGACAACTTC
 35 AGGATCAAAGCTACTTGTCTAAATACACATTAACOCAGOGATOGCTCATGGGATTAGC
 GAGTATGTAGGTTGAGTAGAGTGGGCAAGTGGCTGACTTGGTATTGTGGAGTCCAGCA
 TTCTTTGGOGTGAACOCACATGATCATCAAGGOGGATTCAATTGOGTTAAGOCAAATG
 40 GOGATGOGAAGCTTCTATOOCTAOCOCACAAGGTTTATTACAGAGAAATGTTGGCT
 CATCATGGTAAAGCTAAATAOGATGCAACATCACTTTTGTGTCTCAAGOGGCTTATGAC
 AAAGGCATTAAAGAAGATTAGGACTTGAAAGACAAGTGTGGOOGTAAAAAATTGCAGA
 45 AATATCACTAAAAAGACATGCAATTCAAGACACTACTGCTCACATTGAAGTCAATCT
 GAACTTACCATGTGTGTTGGTGGATGGCAAGAAGTAACTTCTAAACAGOCATAAAGTG
 AGCTTGGGCACTCTTAGCATTTCCTAG

1710

50

- ou les enchaînements de nucléotides complémentaires respectivement des enchaînements (I) (II) (V) et (VII) sus-mentionnés.

8. Séquence de nucléotides, caractérisée en ce qu'elle comprend un enchaînement de nucléotides selon la revendication 7 ou qu'elle est constituée par au moins une partie de cet enchaînement.

9. Séquence de nucléotides correspondant, selon le code génétique universel, à la séquence (III) en acides aminés suivante:

KLLGVLVYQKSKNALSSQAIVATNMSNLALKEYLKSQDLELKHCAIGDKFVSECMRLNK ANFGGEQSGHIIFS-

DYAKTGDGLVCALQVSALVLESKL

10. Séquence de nucléotides correspondant, selon le code génétique universel, à la séquence (IV) en acides aminés suivante:

NMTTPFMAKSLNSVAVKPLREGMSQSNNPSKEELDIITNALIVDYTGYYKADIGIKDGK IA-
5 GIGKGGNKDMQDGVKNNLSVGPATEALAGEGLIVTAGGIDTHIHFI SPQQIPTAFRSG VTTMIGGGTG PADGT-
NATTITPGRRLKWWMLRAAEEYSMNLGFLAKGNASNDASLADQIE AGAIGFKIHEDWGTTSPAINHA

11. Séquence de nucléotides correspondant, selon le code génétique universel, à la séquence (VI) en acides aminés suivante:

10 |
MKLIPKELDKMLHYAGELAKKRKEKGDKLNYVEAVALLSAHMEEARAGKKTAAELMOE
GRTLLKPDVMDGVASMIHEVGDIAFFDGTGLVTVHTPIEANGKLVGELFLKNE DITI
15 NEGKAVSVKVNVDGDRPVQIGSHFHFTEVNFCLDFDREKTFGKRLDIASGTAVRFE DGE
EKSVELIDIGGRRIFGFNALVDPOADNESKKTALFRAKERGFHGAKSODNYVKTKE
20 739

12. Séquence de nucléotides correspondant, selon le code génétique universel, à la séquence (VIII) en acides aminés suivante:

25 |
MKKSRKEYYSMYGPTTGDKVRLGOTDLAEVEHDYTYGEELKFGGGKTUREGM
SQSNPSKEELDIITNALIVDYTGYYKADIGIKDGKAGIGKGGNKDMQDGVKNN
30 LSVGPATEALAGEGLIVTAGGIDTHIHFI SPQQIPTAFASGVTTMIGGGTG PAD
GTNATITTPGRRLKWWMLRAAEEYSMNLGFLAKGNASNDASLADQIEAGAGF
35 KIHEDWGTTSPAINHALDVADKYDVQVAIHTDTUNEAGCVEDTMAAAGRTMH
TFHTEGAGGGHAPDIHKVAGEHNILPASTNPTIPFTVNTAEHMDMLMVCHILD
40 KSIKEDVQFADSRIRPQTAAEDTLHDMGIFSTSSDSQAMGRVGEVITRTWQT
ADKNKKEFGRLKEEKGDNDNFRIKRYLSKYTINPAIHGISEYVGSVEVGKVADL
VLWSPAFFGVKPNMIKGGFIALSQMGDANASIPTQPYYREMFHGHGKAKYD
45 ANITFVSQAAYDKGIKEELGLERQVLPVKNCRNITKDMQFNDTTAHIEVNPETY
HVFVDGKEVTSKPANKVSLAQLFSIF
50 569

13. Vecteur recombinant, notamment plasmide ou cosmide recombinant, capable de transformer une cellule hôte appropriée, ledit vecteur contenant une séquence de nucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 12 sous le contrôle d'éléments de régulation permettant l'expression de ce fragment dans la cellule hôte.

55 14. Plasmide pILL590 porté par la souche E.coli S17-1 déposée le 16 août 1988 sous le numéro I-795 à la C.N.C.M.

15. Souche de micro-organisme transformée à l'aide d'au moins un vecteur selon la revendication 13

ou 14 ou d'une séquence de nucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 12.

16. Protéine à activité uréase du type de celle exprimée chez C.pylori et ses fragments peptidiques, correspondant, selon le code génétique universel, aux séquences de nucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 12.

5 17. Protéine à activité uréase du type de celle exprimée chez C.pylori, telle qu'obtenue par transformation de cellules hôtes au moyen d'un vecteur recombinant selon la revendication 13 ou 14, mise en culture, dans un milieu approprié, des cellules hôtes transformées et récupération de l'uréase à partir de ces cellules ou directement à partir du milieu de culture.

18. Anticorps polyclonal ou monoclonal, caractérisé en ce qu'il est dirigé contre toute ou partie de la
10 protéine, ou de ses fragments, selon la revendication 16 ou 17.

19. Anticorps polyclonal ou monoclonal, caractérisé en ce qu'il est dirigé contre toute ou partie de la séquence déterminée par les acides aminés situés aux positions 206 et 338 de la séquence VIII selon la revendication 12.

20. Sonde de détection caractérisée en ce qu'elle comprend tout ou partie des séquences de
15 nucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 12.

21. Procédé de dépistage in vitro de la présence éventuelle de C.pylori dans un échantillon susceptible de le contenir, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

- éventuellement l'amplification préalable de la quantité de séquences de nucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, susceptibles d'être contenues dans l'échantillon, à l'aide d'amorces
20 susceptibles respectivement de se lier, d'une part à l'extrémité 5' d'un brin de ladite séquence de nucléotides et d'autre part, à l'extrémité 3' de l'autre brin de ladite séquence de nucléotides,
- la mise en contact de l'échantillon biologique sus-mentionné avec une sonde nucléotidique selon la revendication 20, dans des conditions permettant la production d'un complexe d'hybridation formé entre ladite sonde et ladite séquence de nucléotides,
- 25 - la détection du susdit complexe d'hybridation.

22. Procédé de dépistage in vitro de la présence éventuelle de C.pylori dans un échantillon biologique susceptible de le contenir, caractérisé en ce qu'il comprend:

- la mise en contact de l'échantillon avec un anticorps selon la revendication 18 ou 19, dans des conditions permettant la production d'un complexe immunologique formé entre tout ou partie de la protéine à activité
30 uréase produite par C.pylori et cet anticorps, et
- la détection du complexe immunologique.

23. Nécessaire ou kit pour la mise en oeuvre d'une méthode de dépistage in vitro de la présence éventuelle de C.pylori dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend:

- une quantité déterminée d'une sonde nucléotidique selon la revendication 20,
- 35 - avantageusement un milieu approprié à la formation d'une réaction d'hybridation entre la séquence à détecter, et la sonde sus-mentionnée,
- avantageusement des réactifs permettant la détection des complexes d'hybridation formés entre la séquence de nucléotides et la sonde lors de la réaction d'hybridation.

24. Nécessaire ou kit pour la mise en oeuvre d'une méthode de dépistage in vitro de la présence
40 éventuelle de C.pylori dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend:

- une quantité déterminée d'un anticorps selon la revendication 18 ou 19,
- avantageusement un milieu approprié à la formation d'une réaction immunologique entre au moins une partie d'une protéine à activité uréase produite par une souche de C.pylori et l'anticorps,
- avantageusement, des réactifs permettant la détection des complexes immunologiques formés entre au
45 moins une partie de la protéine uréase et l'anticorps lors de la réaction immunologique.

25. Utilisation en tant qu'amorces dans des techniques d'amplification d'ADN, de type PCR, de deux séquences de nucléotides d'environ au moins 20 nucléotides, compris dans l'une des séquences selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, et distantes de 200 à 250 nucléotides environ, l'une des séquences étant capable de se lier à l'extrémité 5' d'un brin de la séquence à amplifier et la deuxième
50 séquence à l'extrémité 3' de l'autre brin.

26. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend des anticorps selon la revendication 18 ou 19 en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

27. Composition immunogène caractérisée en ce qu'elle comprend toute ou partie d'une protéine selon la revendication 16 ou la revendication 17 en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

55 28. Composition selon la revendication 27 caractérisée en ce qu'elle comprend toute ou partie de la séquence délimitée par les acides aminés situés aux positions 206 et 338 de la séquence VIII selon la revendication 12.



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numero de la demande

EP 89 40 2764

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.5)
Y	CHEMICAL ABSTRACTS vol. 109, no. 7, 15 août 1988, page 289, column 2, abstract no. 50580d, Columbus, Ohio, USA; H.L.T. MOBLEY et al.: "Characterization of urease from Campylobacter pylori" & J. Clin. Microbiol. 1988, vol. 26, no. 5, pages 831-836	1,9-12, 17-24, 26-28	C 12 N 15/55 C 12 N 9/78 C 12 Q 1/68 G 01 N 33/569 A 61 K 39/106 C 12 P 21/02
X	idem ---	16	
Y	WO-A-8 604 422 (INTEGRATED GENETICS, INC.) * document en entier, en particulier pages 6,7 *	1,9-12, 17,20, 21,23	
Y	WO-A-8 701 119 (G. WINN) * document en entier *	18,19, 22,24, 26-28	
D,A	JOURNAL OF BACTERIOLOGY vol. 169, no. 11, novembre 1987, pages 5320-5323, Baltimore, USA; A.LABIGNE-ROUSSEL et al.: "Gene Transfer from Escherichia coli to Campylobacter Species: Development of Shuttle Vectors for Genetic Analysis of Campylobacter jejuni" * document en entier *	13-15	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5) C 12 N 15/55 C 12 N 9/78 C 12 Q 1/68 G 01 N 33/569 A 61 K 39/106
---		-/-	
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lien de la recherche BERLIN		Date d'achèvement de la recherche 22-12-1989	Examinateur JULIA P.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			



EP 89 40 2764

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.5)
A	CHEMICAL ABSTRACTS vol. 108, no. 19, 9 mai 1988, abstract no. 164225b, Columbus, Ohio, USA; S. MAJEWSKI et al.: "Restriction endonuclease analysis of the genome evidence for considerable genomic variation" & J. Infect. Dis. 1988, vol. 157, no. 3, pages 465-471 ---	1,2,4,5	
A	EP-A-0 200 362 (CETUS CORP.) * abrégé; colonne 10, ligne 48 - colonne 11, ligne 14; colonne 26, lignes 9-22; colonne 28, lignes 11-29; colonne 46, exemple 11; revendications * ---	25	
A	JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY vol. 27, no. 1, 1988, pages 33-40, Edinburgh, GB; R.L. FERRERO et al.: "The urease enzymes of Campylobacter pylori and a related bacterium" * abrégé; page 35, colonne 1, page 36, colonnes 1,2; page 39, colonnes 1,2 * ---	1,16-19 ,22,24, 26-28	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
A	EP-A-0 204 438 (B.J. MARSHALL) * document en entier * ---	16,21- 24	
P,X	CHEMICAL ABSTRACTS vol. 110, no. 13, 27 mars 1989, page 199, colonne 1, abrégé no. 109392v, Columbus, Ohio, USA; C.L. CLAYTON et al.: "Molecular cloning and expression of Campylobacter pylori species-specific antigens in Escherichia coli K-12" & Infect. Immun. 1989, vol. 57, no. 2, pages 623-629 -----	1-3,13, 15-19, 22,24	
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche BERLIN		Date d'achèvement de la recherche 22-12-1989	Examineur JULIA P.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ----- & : membre de la même famille, document correspondant			

ANHANG

zum internationalen Recherchen-
bericht über die internationale
Patentanmeldung Nr.

ANNEX

to the International Search
Report to the International Patent
Application No.

ANNEXE

au rapport de recherche inter-
national relatif à la demande de brevet
international n°

PCT/EP 93/03059 SAE 82132

In diesem Anhang sind die Mitglieder
der Patentfamilien der im obenge-
nannten internationalen Recherchenbericht
angeführten Patentedokumente angegeben.
Diese Angaben dienen nur zur Unter-
richtung und erfolgen ohne Gewähr.

This Annex lists the patent family
members relating to the patent documents
cited in the above-mentioned inter-
national search report. The Office is
in no way liable for these particulars
which are given merely for the purpose
of information.

La présente annexe indique les
membres de la famille de brevets
relatifs aux documents de brevets cités
dans le rapport de recherche inter-
national visé ci-dessus. Les renseigne-
ments fournis sont donnés à titre indica-
tif et n'engagent pas la responsabilité
de l'Office.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument Patent document cited in search report Document de brevet cité dans le rapport de recherche		Datum der Veröffentlichung Publication date Date de publication	Mitglied(er) der Patentfamilie Patent family member(s) Membre(s) de la famille de brevets	Datum der Veröffentlichung Publication date Date de publication
WD A1	9307273	15-04-93	FR A1 2682122	09-04-93
EP A1	367644	09-05-90	FR A1 2637612	13-04-90
			FR B1 2637612	10-09-93
			JP T2 3501928	09-05-91
			WD A1 9004030	19-04-90